

КОЛЛАГЕН ИЗ КОЖИ ЛОШАДЕЙ – НОВОЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНОЕ ВЕЩЕСТВО

Л.П. Истранов, докт. фарм. наук, профессор, Е.В. Истранова, канд. фарм. наук
НИИ молекулярной медицины Первого Московского государственного
медицинского университета им. И.М. Сеченова;
119991, Москва, Трубецкая ул., д.8, стр. 2

E-mail: prof.Istranov@gmail.com

Изучение химического и аминокислотного состава щелочно-обработанного коллагена кожи лошадей, а также физико-химических свойств получаемых из него уксуснокислых растворов показало, что коллаген кожи лошадей может заменять коллаген кожи коров в технологии коллагеновых препаратов и изделий медицинского назначения.

Ключевые слова: вспомогательное вещество, коллаген, кожа лошади, свойства.

Биополимер коллаген обладает уникальными медико-биологическими и физико-химическими свойствами. Благодаря этим свойствам он находит широкое применение в медицине в качестве полимерной основы раневых повязок (пленки, губки, волокнистые материалы), местных гемостатических средств, мягких лекарственных форм (гели, кремы), инъекционных растворов и других лекарственных форм и изделий медицинского назначения [1–6]. Исходное сырье для производства субстанции диспергированного коллагена – дерма крупного рогатого скота. В России для заводского производства в больших объемах раневых покрытий обычно используют гольевой спилки дермы коров, в отдельных случаях – коллаген кожи свиной [7] и лошадей. Но кожа свиной содержит большое количество жира, что создает трудности с его удалением и последующим растворением. В литературе отсутствует информация об использовании коллагена кожи лошадей для изготовления препаратов и изделий медицинского назначения, хотя в рекламе есть сведения о применении фибрилл кожи лошадей (tachotop) для изготовления гемостатических средств и раневых повязок [8].

В странах Евросоюза существует запрет на использование коллагена дермы коров для изготовления материалов медицинского назначения вследствие возможного заражения вирусом «коровьего бешенства». Поэтому необходим поиск нового доступного источника коллагенсодержащего сырья, не являющегося носителем данного вируса. В этом от-

ношении несомненный интерес представляет кожа лошадей, которая применяется в кожевенной промышленности.

Дерма лошадей менее изучена. По своей структуре она заметно отличается от дермы коров, имеет более плотное волокнистое строение и более высокую структурную стабильность по отношению к воде, кислотам, щелочам. При этом структура дермы зависит от топографии, задняя часть кожи (которая носит название «шпигель») по своей структуре существенно отличается от передней.

Традиционная щелочно-солевая обработка, используемая для гольевого спилка крупного рогатого скота, не приводит к растворению коллагена лошадей в органических кислотах. Нами подобраны параметры щелочно-солевой обработки, позволяющие получить 2% субстанцию коллагена из дермы лошадей. Цель настоящей работы – изучение состава и физико-химических свойств растворов коллагена из дермы лошадей.

Экспериментальная часть

Исходным сырьем для получения коллагена служили шкуры лошадей после соответствующего ветеринарного контроля. Они подвергались известковой обработке со сжиганием волосяного покрова с последующим удалением подкожно-жировой клетчатки и механическим спиливанием верхнего лицевого (базального) слоя на глубину залегания волосяных сумок. Таким образом, фактически использовали средний слой дермы лошадей.

Химический состав дермы до и после обработки оценивали по содержанию золы (сжигание производили при температуре 600°C), влаги, жира (экстракция в аппарате Сокслета), общего азота (метод Кьельдаля), оксипролина. Аминокислотный состав исходной и обработанной дермы, высушенной лиофильно, определял канд. хим. наук А.Л. Ксенофонов в НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова на аминокислотном анализаторе Hitachi L-8800 после гидролиза

в смеси концентрированной хлористоводородной и трифторуксусной кислот в соотношении 2:1 с добавлением меркаптоэтанола при температуре 155°C в течение 1 ч.

После щелочно-солевой обработки, нейтрализации, удаления солей тщательной промывкой водой, измельчения в мясорубке дерму растворяли в 3% уксусной кислоте и готовили 2% субстанцию коллагена кожи лошадей.

Вязкость растворов и ее зависимость от концентрации и температуры изучали с помощью капиллярных вискозиметров ВПЖ с диаметром капилляра 0,9 мм и Убеллоде с диаметром капилляра 0,6 мм. Определяли время истечения раствора кол-

лагена и растворителя при температуре 20°C и рассчитывали относительную, удельную и приведенную вязкости:

$$v_{\text{отн}} = t_{\text{раствора}} / t_{\text{растворителя}}; v_{\text{уд}} = v_{\text{отн}} - 1; v_{\text{прив}} = v_{\text{уд}} / c;$$

где $t_{\text{раствора}}$ – время истечения раствора коллагена, $t_{\text{растворителя}}$ – время истечения растворителя, c – концентрация раствора коллагена в г/100.

Далее строили график зависимости $v_{\text{прив}} = f(c)$ и определяли экстраполяцией на нулевую концентрацию характеристическую вязкость раствора коллагена лошадей $[\eta]$. Температуру денатурации раствора коллагена определяли с помощью графика зависимости $v = f(t)$ как температуру, при которой исходная вязкость падала в 2 раза (скорость повышения температуры – 0,5°C в мин, выдерживание при заданной температуре – 5 мин).

Таблица 1

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ИСХОДНОЙ И ОБРАБОТАННОЙ ДЕРМЫ ЛОШАДЕЙ

Дерма	Влага, %	Зола, %	Жир, %	Общий азот, %	Оксипролин
Лошадей, исходная	12,7	5,0	0,96	14,1	13,3
Лошадей, обработанная	16,2	2,0	0,6	14,4	13,92
Коров, обработанная	18,1	0,30	0,15	14,8	14,50

Таблица 2

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ИСХОДНОЙ И ОБРАБОТАННОЙ ДЕРМЫ ЛОШАДЕЙ (КОЛИЧЕСТВО АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ НА 1000 ОСТАТКОВ В БЕЛКЕ)

Аминокислоты	Исходная кожа лошадей	Обработанная кожа лошадей	Базальный слой кожи лошадей	Обработанная кожа коров
Оксипролин	70,7	66,0	57,7	92,0
Аспарагиновая кислота	41,4	42,5	50,0	48,0
Треонин	17,5	14,8	15,8	17,0
Серин	22,0	20,5	20,5	38,0
Глутаминовая кислота	70,9	69,9	73,1	72,0
Пролин	158,0	166,9	159,6	129,0
Глицин	344,7	354,8	355,4	334,0
Аланин	111,1	110,8	116,5	105,0
Валин	22,8	23,7	25,3	19,0
Метионин	3,3	2,6	2,1	6,6
Изолейцин	10,4	9,0	7,8	11,0
Лейцин	24,7	23,1	20,9	25,0
Тирозин	3,3	0,5	0,2	4,7
Фенилаланин	14,5	12,5	13,3	13,0
Оксилизин	2,7	3,5	3,3	6,8
Лизин	26,6	26,2	25,2	25,0
Гистидин	7,3	5,3	4,8	4,6
Аргинин	48,0	47,5	48,4	48,0

Зависимость оптической плотности раствора коллагена лошади от pH рассчитывали при помощи фотоэлектрического колориметра ФЭК 5.

Кожа лошадей состоит из плотной сети коллагеновых волокон, в составе которых присутствуют минеральные компоненты, жир, клетки, тканевые белки и их комплексы с углеводами. В процессе предварительных обработок удаляются: волосяной покров, подкожно-жировая клетчатка, базальный слой, клетки, растворимые тканевые белки и их комплексы с углеводами.

Химический состав коллагена кожи лошадей (табл. 1) незначительно изменяется в процессах щелочно-солевой обработки. Несколько снижается содержание жира и минеральных составляющих, соответственно повышается содержание общего азота и оксипролина. Химический состав коллагена кожи лошадей и кожи коров после щелочно-солевой обработки практически идентичен.

Аминокислотный состав коллагена кожи лошадей исходной и после щелочной обработки (табл. 2) также практически одинаков. Колебания в содержании отдельных аминокислот находятся в пределах погрешностей метода. Аминокислотный состав

коллагена кожи лошадей и коров практически идентичен. Однако аминокислотный состав базального слоя отличается от аминокислотного состава коллагена кожи лошадей и коров.

Результаты изучения химического и аминокислотного состава позволяют считать, что после щелочно-солевой обработки и растворения в уксуснокислых растворах присутствуют фактически идентичные по составу макромолекулы коллагена дермы лошадей и коров.

Уксуснокислые 2% растворы коллагена кожи лошадей по внешним данным идентичны соответствующей субстанции коллагена кожи коров: полупрозрачный, высоковязкий концентрированный раствор, текучий при концентрации коллагена 1,5% и ниже. Для определения молекулярных параметров изучили свойства разбавленных растворов коллагена после фильтрования и диализа для удаления низкомолекулярных примесей возможных продуктов гидролиза.

Измерение вязкости, зависимость вязкости от концентрации и экстраполяция на нулевую концентрацию показали, что предельное число вязкости (η)²⁰ (характеристическая вязкость) для раствора коллагена лошади находится в пределах $12,8 \pm 1,8$. Высокое значение (η)²⁰, идентичное показателям (η)²⁰ растворов тропоколлагена, ателоколлагена, щелочно-растворенного коллагена, свидетельствует о наличии в растворе стержне-подобных макромолекул с молекулярной массой 300000 Да и выше [9, 10]. При нагревании вязкость растворов резко и необратимо падает в интервале температур 32–40°C. Это указывает на характерный для растворов тропоколлагена процесс денатурации, связанный с разрушением трехспиральной структуры макромолекулы и превращением ее в глобулярную. Температура денатурации как средняя температура резкого падения вязкости соответствует 35°C, что идентично температуре денатурации щелочно-растворенного коллагена дермы коров [9].

При добавлении к уксуснокислому раствору солей: хлоридов и сульфатов натрия, сульфата аммо-

ния и других, спирта, ацетона, солей тяжелых металлов, алкалоидов осаждаются волокнистые осадки коллагена. По своим электрохимическим свойствам щелочно-растворенные коллагены кожи лошадей и кожи коров идентичны.

При воздушной сушке коллаген кожи лошадей так же, как и коллаген кожи коров, образует прозрачные пленки, а после замораживания и сублимационной сушки – высокопористые губки.

Таким образом, согласно полученным данным, как вспомогательное вещество коллаген кожи лошадей может заменять коллаген кожи коров в технологии производства коллагеновых препаратов и изделий медицинского назначения.

Вывод

Изучение состава и физико-химических свойств щелочно-обработанного коллагена кожи лошадей, а также получаемых из него уксуснокислых растворов показало фактически их полную идентичность с широко используемыми растворами щелочно-обработанного коллагена из дермы коров.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Chvapil M., Kronenthal R.L., Winkle W.V. Inter. Review of Connect. Tiss. Res., 1973; 6: 11–61.
2. Chvapil M., J.Biomed. Mater.Res., 1982; 16: 245–263.
3. Коллагенопластика в медицине (под ред. В.В Кованов, И.А. Сычеников). М.: Медицина, 1976. (Collagenoplasty in medicine (ed. V.V. Kovanov, I.A. Sychenikov). Moscow: Medicine, 1976 (in Russian)).
4. Ширшакова М. Журнал прикладной эстетики, 2006; 1. (2): 96–100. (Shirshakova M. Journal of applied aesthetics, 2006; 1. (2): 96–100 (in Russian)).
5. Parentean-Bariel R., Gauvin R., Berthod F., Materials, 2010; 3: 1863–1887.
6. Khan R., Khan V.N., Bee A. Biology and Medicine, 2011; 3.(4): 25–32.
7. Егорова М., Журнал прикладной эстетики, 2006; 1. (2): 110–112. (Yegorova M., Journal of applied aesthetics, 2006; 1. (2): 110–112 (in Russian)).
8. Edelman-Grill B., Ottok C., Arzneim-Forsch. Drug Res., 1987; 37(11), 7: 802–808.
9. Истранов Л.П., Истранова Е.В., Сычеников И.А. Фармация, 1984; 5: 76. (Istranov L.P., Istranova E.V., Sychenikov I.A. Farmatsiya, 1984, 5, 76 (in Russian)).

Поступила 11 марта 2014 г.

EQUINE SKIN COLLAGEN IS A NEW ADJUVANT

Professor L.P. Istranov, PhD; E.V. Istranova, PhD

Research Institute of Molecular Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; 8, Trubetskaya St., Build. 2, Moscow 119991

SUMMARY

The investigation of the chemical and amino acid composition of alkaline-treated equine skin collagen and the physicochemical properties of its derived acetous solutions showed their identity with the much used solutions of alkaline-treated bovine skin collagen. The findings suggest that equine skin collagen may be used as an adjuvant and may replace bovine skin collagen in the technology of collagen preparations and medical products.

Key words: adjuvant, collagen, equine skin, properties.